

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 486—488, November 1971

Anmerkungen zur Methodik der quantitativen gaschromatographischen Zuckeranalyse

VON B. SALFNER

*Aus der Abteilung Immunbiologie (Leiter: Prof. Dr. G. Uhlenbruck) der Medizinischen
Universitätsklinik Köln-Lindenthal*

(Eingegangen am 8. Juli 1971)

Die Arbeit beschreibt methodische Verbesserungen der quantitativen gaschromatographischen Zuckeranalyse. Die Änderungen betreffen die Hydrolyse, die Gleichgewichtseinstellung der Zuckeranomeren und die N-Acetylierung der Aminosucker. Die Methode wird mit Hilfe der Analyse von Standard-Zuckergemischen geprüft.

Observations on the quantitative analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography

The quantitative analysis of sugars by gas-liquid chromatography was improved by the modification of the hydrolysis, the equilibration of sugar anomers and the N-acetylation of hexosamines. The method was tested with standard mixtures of carbohydrates.

In einer früheren Arbeit (1) haben wir die gaschromatographische Analyse des Kohlenhydratanteiles serologisch aktiver Glykoproteine beschrieben. Wir versuchten dabei darzustellen, daß die quantitative Analyse komplexer Kohlenhydratketten trotz bestehender Fehlermöglichkeiten mit ausreichender Genauigkeit durchzuführen ist, da wir geringe Verunreinigungen der zur Analyse verwendeten Ausgangssubstanzen nicht ausschließen konnten. Die vorliegende Arbeit baut auf den Erfahrungen der ersten Arbeit auf und gibt einen Überblick über die methodischen Verbesserungen, die für die exakte Analyse reiner Substanzen erforderlich sind. Die Methode wurde im wesentlichen in drei Punkten geändert:

1. in der Auswahl der hydrolytischen Bedingungen
2. in der Einführung eines Abschnittes für die Gleichgewichtseinstellung der Anomeren
3. in der N-Acetylierung der Aminosucker.

Auswahl der Hydrolysebedingungen

Von verschiedenen Untersuchern wird bestätigt (2, 3), daß es die optimale Hydrolysebedingung, die für alle Monosaccharide eines Glykoproteins gleichermaßen geeignet ist, nicht gibt. Da die zur Verfügung stehende Substanzmenge meist gering ist, müssen wir uns in der Regel auf zwei parallel durchgeführte Analysen beschränken. Wir führen neben einer Hydrolyse mit wasserfreier methanolischer HCl (1,5–2N HCl für 3 Stdn. bei 100°) eine zweite Hydrolyse in wäbr. HCl bei höherer Säurekonzentration durch (3–4N HCl für 3 Stdn. bei 100°). Methylglykoside erscheinen uns aus den beschriebenen Gründen (1) für die Analyse von Hexosen am geeignetsten. Die Hydrolyse mit wäbr. HCl ist für die Bestimmung von Aminosuckern notwendig, da erstens die Überführung der Hexosamine in Methylglykoside unvollständig ist und zweitens die zur

vollständigen glykosidischen Spaltung der Hexosamine erforderlichen hohen Säurekonzentrationen bei der Methanolyse zu Ringisomerisierungen und damit zu einer Vermehrung der Peaks führen (1, 3, 4). Die von uns zur Hydrolyse eingesetzten Substanzmengen betragen 2–5 mg. Die methodische Durchführung der Methanolyse wurde bereits beschrieben, die Hydrolyse in wäbr. HCl unterscheidet sich methodisch nicht.

Einstellung des Anomerengleichgewichtes

Für die Überführung der Monosaccharide in flüchtige Derivate stehen mehrere Verfahren zur Auswahl. Am häufigsten verwandt werden jedoch Trimethylsilyl-Derivate und Alditolacetat-Derivate, vor allem wohl deshalb, weil sie am leichtesten quantitativ aufbereitet werden können. Trimethylsilyl-Derivate haben einige Vorteile gegenüber Polyalkoholen von Monosacchariden:

1. die Aufbereitung ist einfacher und zeitsparender
2. Trimethylsilyl-Derivate von Aldohexosen werden auf vergleichbaren Säulen besser getrennt
3. Trimethylsilyl-Derivate erlauben im Gegensatz zu Alditolacetat-Derivaten die Analyse von Ketozuckern.

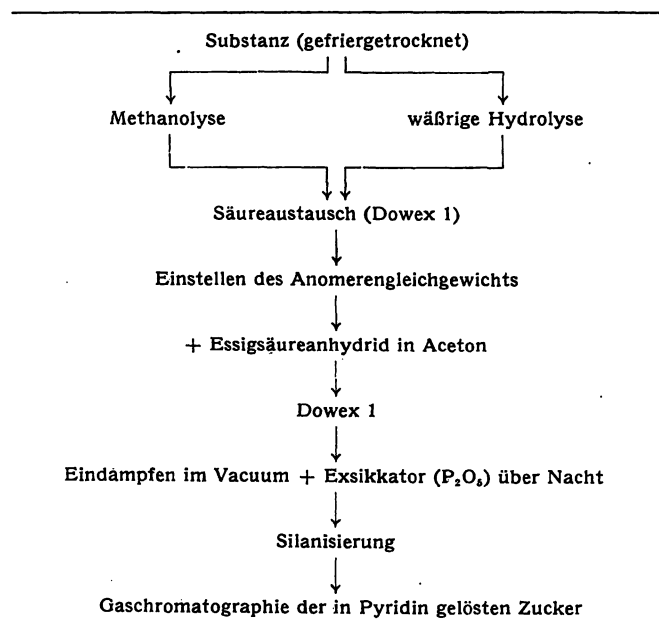
Das Problem bei der Analyse von Trimethylsilyl-Zuckern ist jedoch die Anomerentrennung. Eine vollständige Trennung sämtlicher Anomeren ist bisher nicht gelungen. Bei unseren Analysen treten Überlagerungen der Peaks von β -Fucose/ α -Xylose, β -Galaktose/ α -Glucose und β -N-Acetyl-Galaktosamin/ β -N-Acetyl-Glucosamin auf. Die quantitative Analyse dieser Zucker ist nur unter Einbeziehung eines konstanten Anomerengleichgewichtes in die Berechnung möglich. Die Zeitdauer der Gleichgewichtseinstellung der in H_2O gelösten Monosaccharide wird am Beispiel der Glucose aus Tabelle 1 ersichtlich. Das Verhalten der übrigen Monosaccharide ist dem der Glucose ver-

Tab. 1
Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts
Anomerenverhältnis der Glucose nach verschiedenen Zeiten der
Äquilibriumierung in dest. Wasser

Dauer [Min.]	Glucose-Anomer [% der Peakfläche]	
	α -	β -
—	84,43	15,57
15	54,74	45,26
30	47,33	52,67
60	46,15	53,85
90	44,84	55,16
120	41,98	58,02
180	41,70	58,30

gleichbar. Das Anomergleichgewicht hat sich nach etwa 2 Stunden eingestellt. Aus diesen Untersuchungen leiten wir die Forderung nach der Zwischenschaltung einer 2–3ständigen Einstellungszeit im Anschluß an die Hydrolyse ab. Es ist nämlich durchaus vorstellbar, daß Monosaccharide, die erst gegen Ende der Hydrolyse glykosidisch gespalten werden, bei „zügiger“ Aufbereitung der Substanz die Einstellung des Gleichgewichts nicht erreichen. Die Durchführung der Probenvorbereitung und der Zeitpunkt der Zwischenschaltung der Einstellungszeit für das Anomergleichgewicht ist aus Schema 1 zu ersehen.

Schema 1



N-Reacetylierung der Aminosucker

Die von uns bisher angewandten Methoden der N-Reacetylierung (1, 5, 6) sind in ihrem Ergebnis unbefriedigend, die Acetylierungsquote liegt dabei unter 50%. LEVY und Mitarbeiter (3) beschrieben nun eine neue Methode, die eine nahezu vollständige N-Acetylierung gewährleisten soll. Die Vollständigkeit dieser Reaktion ist für die exakte quantitative Analyse einer Substanz aus zwei Gründen unumgänglich. Einmal ist die Silanisierung nicht acetylierter Aminosucker unvollständig (60%!), zum anderen ist eine quantitative Berechnung durch Überlagerungen der Peaks nicht möglich.

Arbeitsvorschrift

Etwa 2 mg Hexosamin-HCl bzw. ein Hexosamin-Hexosen-Gemisch werden in 1,75 ml 3N HCl gelöst. Danach wird in einem zugeschmolzenen, dickwandigen Röhrchen unter N_2 für 3 Stdn. bei 100° hydrolysiert. Überführen in ein Reagenzglas und Zugabe von 3,25 ml dest. Wasser. In einem Parallelversuch werden unter Umgehung der Hydrolyse 3,25 ml dest. Wasser sofort zu der in HCl gelösten Substanz gegeben.

Die Beseitigung der Säure erfolgt mit Hilfe des Anionenaustauschers Dowex 1 X 4 (Carbonat-Form; Säule 1 x 6 cm). Die Substanz wird in kleinen Portionen aufgetragen. Wiederholtes Beklopfen der Säule ist notwendig, damit das entstehende CO_2 entweichen kann. Dowex 1 wurde mit 1M Na_2CO_3 in die Carbonat-Form überführt. Die Eluierung erfolgt mit dest. Wasser, der pH-Wert des Eluates wird wiederholt gemessen. Die ersten 2 ml werden verworfen, die nächsten 16 ml gesammelt. Die gesammelte Fraktion wird auf 5 ml eingengt. Nach Einstellen des Gleichgewichts der Anomeren (2–3 Stdn.) wird mit dem gleichen Volumen 0,6proz. (v/v) Essigsäureanhydrid in Aceton versetzt. Das Gemisch wird sorgfältig geschüttelt, 1/2 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann auf eine zweite Säule des gleichen Austauschers aufgetragen. Die zweite Säule wurde zuvor mit 50proz. Aceton in Wasser gespült, die Eluierung erfolgt mit dest. Wasser. Die ersten 5 ml werden verworfen, die folgenden 32 ml gesammelt. Nach Zugabe des gelösten Standards (Erythrit 0,5–1 mg) wird die gesammelte Fraktion am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Entfernung von Feuchtigkeitsresten im Exsikkator über P_2O_5 für 12 Stdn.

Gaschromatographie

Die Silanisierung der Zucker erfolgt mit 1 ml eines Gemisches von Pyridin, Hexamethyldisilazan (Fluka AG) und Trimethylchlorsilan (Serva, Heidelberg) im Verhältnis 7:3:2 (v/v). Das Gemisch wird wiederholt kräftig geschüttelt und 30 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Anteile werden 1–2 μ l der in Pyridin gelösten Zucker in die Säule eingespritzt.

Zur Analyse verwendeten wir einen Gaschromatographen der Firma Hewlett-Packard mit Glassäulen (0,4 cm innerer Ø, 240 cm Länge), Flammenionisationsdetektor und Temperaturprogrammierung. Für die Eluierung der Hexosamine ist eine Temperaturprogrammierung von 155° bis 195° erforderlich. Die quantitative Berechnung erfolgte durch Triangulierung der Peaks.

Ergebnisse der N-Reacetylierung

Die Verwendung eines Ionenaustauschers für die Eliminierung der HCl ist einer Neutralisation mit Na_2CO_3 oder Ag_2CO_3 vorzuziehen, da der Substanzverlust geringer ist. Die gaschromatographische Kontrolle ergibt eine vollständige Eluierung der Substanz aus der Säule. Die Sammelmenge von 16 ml war bei dem verwendeten Säulenvolumen notwendig. Schwierigkeiten hatten wir bei hohen Säurekonzentrationen (über 3N) mit der Entfernung der CO_2 aus den unteren Säulenabschnitten.

Die Methode von LEVY und Mitarbeitern hat zwei Besonderheiten gegenüber den uns bisher bekannten N-Reacetylierungsmethoden: die Lösung des Essigsäureanhydrids in Aceton und die Verwendung eines Anionenaustauschers. Untersuchungen der Teilschritte der Reaktion ergaben, daß die Reacetylierung der in Wasser gelösten, neutralen Substanz nach Zugabe des Essigsäureanhydrid-Aceton-Gemisches stattfinden kann. Der Grad der N-Acetylierung ist dabei jedoch reduziert und die quantitative Rückgewinnung gestört.

Tabelle 2 zeigt den Grad der N-Acetylierung freier Hexosamine. Aufgrund der Flächenberechnung der

Peaks würde sich eine Acetylierung von etwa 97% ergeben. Bezieht man allerdings die unvollständige Silanisierung nicht acetylierter Aminozucker in die Berechnung ein, ergibt sich ein Prozentsatz von 91.

Tab. 2

N-Acetylierung von Hexosaminen. Angabe in % Peakfläche (nicht korrigiert) und unter Berücksichtigung der unvollständigen Silanisierung freier Hexosamine (korrigiert)

	Einwaage	Hexosamin acetyliert [% der Peakfläche]	
		nicht korrigiert	korrigiert
Glucosamin-HCl	2,5 mg	96,76	90,68
Glucosamin-HCl	1,9 mg	97,02	91,16
Galaktosamin-HCl	2,5 mg	97,0	91,11
Galaktosamin-HCl	2,0 mg	96,64	90,98
Durchschnittswert		98,86	90,98

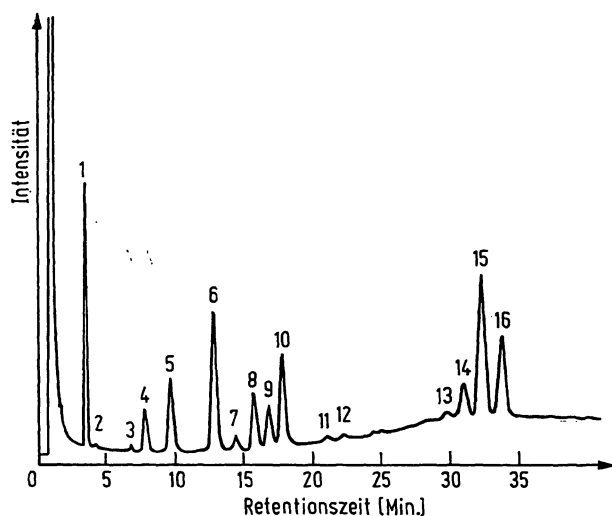


Abb. 1

Gaschromatogramm eines Standard-Zuckergemisches. Bedingungen: Säulenfüllung OV 17,3%, 155–195°, Programmierungsrate 4°/Min. ab Eluierung der Mannose. Empfindlichkeit: 10³/8. 1,2 = Erythrit (interner Standard); 3–5 = Fucose; 6,9 = Mannose; 7, 8, 10 = Galaktose; 11 = Galaktosamin; 12 = Glucosamin; 13 = γ -NAC-Galaktosamin; 14 = α -NAC-Galaktosamin; 15 = α -NAC-Glucosamin; 16 = β -NAC-Galaktosamin + β -NAC-Glucosamin

Die Methode wurde weiterhin auf die Möglichkeit der quantitativen Rückgewinnung von Standard-Zuckergemischen geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Genauigkeit der Analyse nimmt mit der Wiederholung der Versuche deutlich zu. Wir sind daher sicher, daß die quantitative Rückgewinnung der Zucker nach der N-Reacetylierung gewährleistet ist. Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm eines Standard-Zuckergemisches.

Diskussion

Die Genauigkeit der quantitativen Analyse komplexer Glykoproteine wurde mit Hilfe der beschriebenen drei methodischen Verbesserungen so weit gesteigert, daß eine Analyse reiner Substanzen bei beschränkten Substanzmengen mit einer Fehlerbreite unter 4% möglich ist. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist am besten bei Durchführung beider Hydrolysearten. Bei Substanzmengen unter 4 mg beschränken wir uns auf die Hydrolyse mit wäßriger HCl, da die exakte Analyse der Hexosamine für unsere Fragestellungen in der Regel wichtiger ist. Wir nehmen dabei mögliche Verluste an Desoxyhexosen und Pentosen in Kauf. Der für eine Analyse benötigte Arbeits- und Zeitaufwand ist, besonders durch die N-Reacetylierung, größer geworden. Da die hierbei auftretenden methodischen Schwierigkeiten jedoch gering sind, halten wir eine Analysendauer von zwei Tagen für durchaus vertretbar. Schema 1 faßt den Gang der Analyse nochmals kurz zusammen.

Die Untersuchungen wurden durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Herrn Prof. Dr. G. UHLENBRUCK möchte ich für viele Anregungen und seinen Rat bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken. Die Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 68/IV der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Frau H. MEYER danke ich für geschickte technische Assistenz.

Tab. 3

N-Acetylierung von Hexosaminen und quantitative Wiederfindung der Komponenten dreier Monosaccharidgemische mit der Methode nach LEVY

Zucker	eingesetzt (mg)	Gemisch I gefunden (mg)	Fehler (%)	eingesetzt (mg)	Gemisch II gefunden (mg)	Fehler (%)	eingesetzt (mg)	Gemisch III gefunden (mg)	Fehler (%)
L-Fucose	0,9	1,01	+12,2	1,0	1,087	+8,7	2,6	2,64	+1,54
D-Mannose	1,5	1,502	+0,13	1,9	1,897	−0,15			
D-Galaktose	1,8	1,788	−0,65						
D-Glucose	2,0	1,92	−4,0	3,0	2,863	−4,57	1,5	1,458	−2,8
NAC-Galaktosamin	1,2	1,16	−3,4	1,7	1,62	−4,7			
NAC-Glucosamin	3,9	3,75	−3,8	2,1	2,02	−3,8			

Literatur

1. SALFNER, B. und G. UHLENBRUCK, diese Z. 9, 95 (1971).
2. GRAHAM, E. R. B. und A. NEUBERGER, Biochem. J. 106, 593 (1968).
3. LEVY, G. A., A. J. HAY, J. CONCHIE und I. STRACHAN, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 222, 333 (1970).
4. RADHAKRISHNAMURTHY, B., E. R. DALFERES, G. S. BERENSON, Analytic. Biochem. 17, 545 (1966).
5. SWEETLEY, C. C., R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, J. Amer. chem. Soc. 85, 2497 (1963).
6. CLAMP, J. R., G. DAWSON und L. HOUGH, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 148, 342 (1967).

Dr. B. Salfner
Abteilung Immunbiologie der Medizinischen Klinik
5 Köln 41
Kerpenerstr. 15

Der zur Förderung der Forschung gestiftete

HEINRICH-WIELAND-PREIS

wird hiermit satzungsgemäß für das Jahr 1972 ausgeschrieben.

Der Preis, benannt nach dem 1957 verstorbenen Nobelpreisträger Professor Dr. Heinrich Wieland, ist für Arbeiten aus der Chemie, Biochemie und Physiologie der Fette und Lipide sowie über deren ernährungsphysiologische und klinische Bedeutung ausgesetzt und wird jährlich verliehen.

Der HEINRICH-WIELAND-PREIS besteht aus einer »Heinrich-Wieland-Plakette« und einem Geldbetrag in Höhe von 10 000 DM.

Ein Kuratorium, dem zur Zeit die Herren

Prof. Dr. Werner Droese, Dortmund	Prof. Dr. Rudolf Pannhorst, Berlin
Prof. Dr. Werner Heimann, Karlsruhe	Prof. Dr. Gotthard Schettler, Heidelberg
Prof. Dr. Joachim Kühnau, Hamburg	Prof. Dr. Theodor Wieland, Heidelberg
Prof. Dr. Dr. K. Lang, Bad Krozingen	Prof. Dr. Viktor Wolf, Hamburg
Prof. Dr. Nepomuk Zöllner, München	

angehören, wird den Preisträger auswählen.

Einsendeberechtigt für die Verleihung des HEINRICH-WIELAND-PREISES für das Jahr 1972 sind Autoren von unveröffentlichten oder in den Jahren 1970 bis 1972 publizierten wissenschaftlichen Arbeiten. Der eingereichte Beitrag muß in deutscher, englischer oder französischer Sprache abgefaßt sein. Bei fremdsprachlichen Arbeiten ist eine Zusammenfassung (etwa 3 Seiten) in deutscher Sprache erforderlich. Abhandlungen, die bereits mit einem anderen wissenschaftlichen Preis ausgezeichnet sind, können nicht prämiert werden.

Einsendeschluß für die Verleihung im Jahre 1972 ist der 1. März 1972.

Die Arbeiten sind in einem Exemplar bis zu diesem Datum an folgende Anschrift einzusenden:

Kuratorium für die Verleihung des HEINRICH-WIELAND-PREISES

Im Auftrag Prof. Dr. Alfons Fricker, 7501 Grötzingen, Ringelberghohl 12

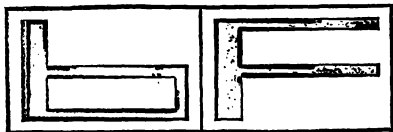
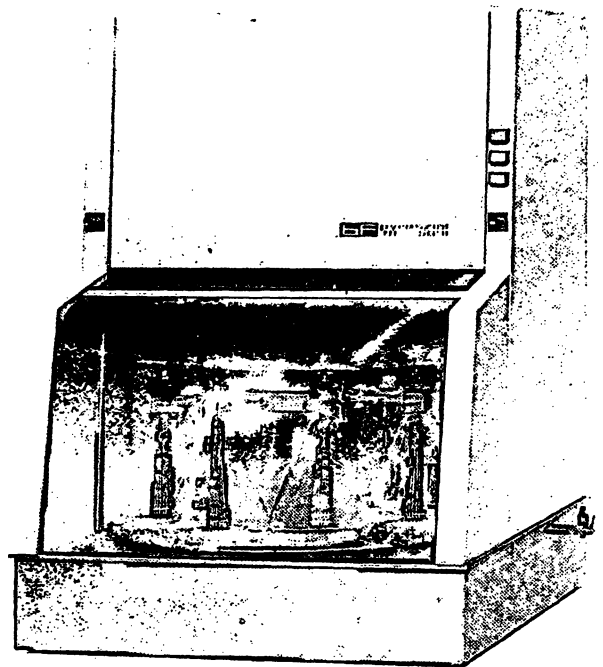
PYROSZINT FHT 5030

ein Verbrennungsautomat
zur Probenvorbereitung
für die Flüssigszintillationsmessung

In einem 1-l-Kolben können auf einem Papierträger von ca. 130 mg Probenmengen bis zu 100 mg verbrannt werden. Verwendet man leichtere Papierträger (Seidenpapier), kann die Probenmenge auf 150–200 mg gesteigert werden.

An das Probenmaterial wird lediglich die Anforderung der Brennbarkeit gestellt, es ist gleichgültig, ob das Material ein starker chemischer oder Farb-Löcher ist, oder ob es sich um in Szintillator unlösliches Material — z. B. biologischer Herkunft — handelt. Auch Flüssigproben, deren Radioaktivität nicht flüchtig ist, können nach Trocknen mit diesem Verfahren bearbeitet werden. Auch ist bei Verwendung eines speziellen Szintillator-Absorbensgemisches die Radioaktivitätsanalyse von $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markiertem Material direkt an einer Probe möglich.

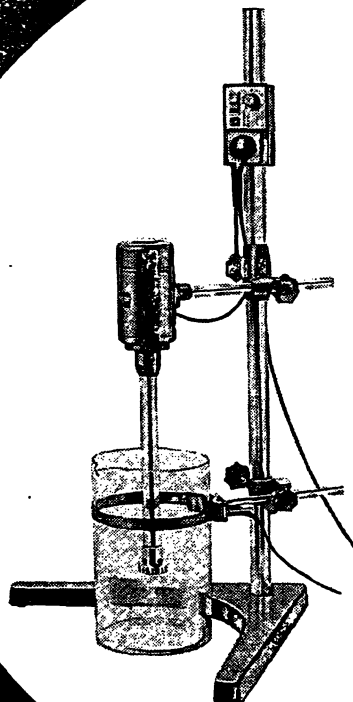
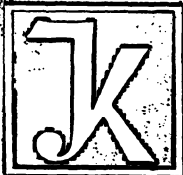
Da für einen Zyklus am Pyroszint ca. 25 min. benötigt werden, können somit inklusive Absorptionszeit 8 Proben in ca. 35 min. verarbeitet werden.



VERTRIEBS-GMBH FÜR MESSTECHNIK

der Firmen Frieske & Hoepfner GmbH · Erlangen-Bruck
und Laboratorium Prof. Dr. Rudolf Berthold · Wildbad

75 Karlsruhe 41 · Bergwaldstraße 30 · Postfach 76 · Tel. (0721) 40 10 11-14 · Telex 7 825 927 · Telegramm Raytec



ULTRA-TURRAX®

Nach Prof. P. Willems

Optimal Dispergieren, Emulgieren,
Homogenisieren in allen Laboratorien mit

ULTRA-TURRAX-
Hochleistungsdispergiergeräte
für das Laboratorium

Wir liefern ULTRA-TURRAX-Laborgeräte für
die Bearbeitung der Stoffsysteme

flüssig/flüssig
flüssig/fest
flüssig/gasförmig

für Mengen von 0,001 l – 40 l.

Jetzt auch unter Luftausschluß.

Große Einsatzbereiche durch austauschbare
Generatoren. Informationsmaterial liegt für
Sie bereit.

Wir
stellen vor:

IKA-WERK · JANKE & KUNKEL KG

Chemisch physikalische Geräte, Apparate und Maschinen
7813 Staufen/Br., Neumagenstr. 16, Telefon 07633/6036
Telex 722922